

**THIS PAGE IS INSERTED BY OIPE SCANNING
AND IS NOT PART OF THE OFFICIAL RECORD**

Best Available Images

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

BLACK BORDERS

TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT

BLURRY OR ILLEGIBLE TEXT

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLORED PHOTOS HAVE BEEN RENDERED INTO BLACK AND WHITE

VERY DARK BLACK AND WHITE PHOTOS

UNDECIPHERABLE GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE THE BEST AVAILABLE
COPY. AS RESCANNING *WILL NOT*
CORRECT IMAGES, PLEASE DO NOT
REPORT THE IMAGES TO THE
PROBLEM IMAGE BOX.**



FR00/2611

#2

BREVET D'INVENTION

REC'D 30 OCT 2000

WIPO

PCT

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

410/028657

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 10 OCT. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30





BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

<p>DATE DE REMISE DES PIÈCES 20 SEPT 1999</p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 9911735</p> <p>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75 INPI PARIS</p> <p>DATE DE DÉPÔT 20 SEP. 1999</p>		<p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS</p>									
<p>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p><input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°</p> <p>Établissement du rapport de recherche <input checked="" type="checkbox"/> différé <input type="checkbox"/> immédiat</p> <p>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non</p> <p>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</p> <p>BACTERIES LACTIQUES TRANSFORMEES POUR LEUR CONFERER UN METABOLISME RESPIRATOIRE, ET LEVAINS COMPRENANT LESDITES BACTERIES</p>		<p>n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone</p> <p>MJPcb539/100FR</p>									
<p>3 DEMANDEUR (S) n° SIREN</p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p>INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)</p> <p>Nationalité (s) Française</p> <p>Adresse (s) complète (s)</p> <p>147, rue de l'Université 75338 PARIS CEDEX 07</p>		<p>code APE-NAF</p> <p>Forme juridique</p> <p>Etablissement public</p> <p>Pays</p> <p>FRANCE</p>									
<p>4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée</p>											
<p>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission</p>											
<p>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</p> <table border="1"><thead><tr><th>pays d'origine</th><th>numéro</th><th>date de dépôt</th><th>nature de la demande</th></tr></thead><tbody><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></tbody></table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
<p>7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date</p>											
<p>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)</p> <p>VIALLE-PRESLES Marie-José (n° 93-2009)</p>		<p>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION</p> <p>SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</p>									

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPcb539/100FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 11735	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
BACTERIES LACTIQUES TRANSFORMEES POUR LEUR CONFERER UN METABOLISME RESPIRATOIRE, ET LEVAINS COMPRENANT LESDITES BACTERIES			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		DUWAT (décédé)	
Prénoms		Patrick	
Adresse	Rue	144, avenue de la République	
	Code postal et ville	92120	MONTRouGE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		GRUSS	
Prénoms		Alexandra	
Adresse	Rue	25, rue Louis Scocard	
	Code postal et ville	91400	ORSAY
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		LE LOIR	
Prénoms		Yves	
Adresse	Rue	12, rue du Docteur Kurzenne	
	Code postal et ville	78350	JOUY-EN-JOSAS
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Le 21 septembre 2000			
M.J. VIALLE-PRESLES (n° 93-2009)			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

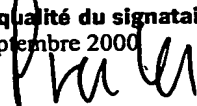
DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPcb539/100FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 11735	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
BACTERIES LACTIQUES TRANSFORMEES POUR LEUR CONFERER UN METABOLISME RESPIRATOIRE, ET LEVAINS COMPRENANT LESDITES BACTERIES			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		GAUDU	
Prénoms		Philippe	
Adresse	Rue	12, allée des Iris	
	Code postal et ville	94260	FRESNES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Le 21 septembre 2000  M.J. VIALLE-PRESLES (n° 93-2009)			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDEICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p. 10				15.05.00	17 MAI 2000 - V D

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

BACTERIES LACTIQUES TRANSFORMEES POUR LEUR CONFERER UN METABOLISME RESPIRATOIRE, ET LEVAINS COMPRENANT LESDITES BACTERIES.

La présente invention concerne l'amélioration des propriétés de conservation et d'acidification des levains lactiques.

Par « levain lactique », on désigne toute préparation destinée à l'ensemencement d'un milieu à fermenter, et comprenant au moins une souche de bactéries lactiques appartenant notamment à l'un des genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Propionibacteria*, ou *Bifidobacteria*, ou un mélange de souches appartenant à un ou plusieurs de ces genres mentionnés ci-dessus.

Les levains lactiques utilisés notamment pour produire des aliments fermentés et des produits d'ensilage sont habituellement préparés en cultures par lots, et sont ensuite concentrés et conditionnés pour une utilisation ultérieure afin d'inoculer différents produits alimentaires en vue de leur fermentation. L'une des préoccupations des producteurs de levains est d'obtenir une biomasse bactérienne importante, et de maintenir une bonne viabilité des bactéries pendant le stockage, afin que lors de l'inoculation, la fermentation démarre rapidement et donne des produits alimentaires possédant des caractéristiques reproductibles.

Or, de nombreuses causes de stress peuvent intervenir lors des différentes étapes de préparation des levains et altérer la survie des bactéries lactiques. En particulier, la viabilité bactérienne peut être rapidement perdue si les cultures sont maintenues en phase stationnaire. L'une des causes en est l'accumulation dans le milieu de produits naturels du métabolisme bactérien, notamment des acides organiques comme l'acide lactique qui entraînent une diminution de pH préjudiciable à la croissance bactérienne. Une autre

cause de perte de viabilité pendant la préparation et le stockage est la présence d'oxygène, qui est naturellement toxique pour les bactéries lactiques ; ces bactéries ont en effet en commun un métabolisme des hydrates de carbone basé sur la fermentation. BERGEY'S manuel, 9^{ème} édition, édité par HOLT et al. (1994) WILLIAMS et WILKINS Eds.

Pour limiter la baisse de pH, on utilise habituellement pour la production de levains de bactéries lactiques, des milieux de culture tamponnés autour de pH 6 avec des cations associés à des carbonates, des hydroxydes, des phosphates ou des oxydes. Cependant, ces apports dans le milieu de culture peuvent entraîner des problèmes pour les productions ultérieures, par exemple en favorisant le développement de phages, ou en augmentant la solubilité des caséines.

Pour éviter les effets toxiques de l'oxygène, la préparation et le stockage des levains sont habituellement effectués en anaérobiose ; par exemple, pendant la préparation des cultures de levains par lots, certaines étapes sont effectuées sous azote, afin d'éliminer les traces d'oxygène. Cependant, lors de l'utilisation des levains, ceux-ci sont fréquemment mis en présence de niveaux élevés d'oxygène. Par exemple, le lait qui est utilisé pour la préparation des produits laitiers fermentés est fortement aéré pendant les processus de transfert et donc riche en oxygène. Ceci pourrait constituer une cause de ralentissement du redémarrage des levains.

Il a été rapporté (A.K. SIJPESTEIJN, Antonie von Leeuwenhoek 36 :335, 1970) que des *Lactococcus* et *Leuconostoc* cultivés en présence d'hème et sous aération produisent des cytochromes et possèdent un métabolisme respiratoire.

Des travaux plus récents [KANeko et al. Appl. Environ. Microbiol., 56 :9, 2644-2649 (1990)], font état d'une amélioration de la prolifération d'une souche de

Lactococcus lactis diacetylactis, cultivée en présence d'hémine et/ou de Cu^{2+} . Cet effet n'est pas attribué à l'apparition d'un métabolisme respiratoire, mais à l'activation de la diacétyl-synthase par l'hémine et/ou le Cu^{2+} , ce qui orienterait préférentiellement le métabolisme fermentaire vers la production de diacétyl, au détriment du lactate.

L'équipe des Inventeurs a récemment découvert que dans le cadre de la préparation de levains lactiques, l'utilisation d'un composé porphyrique associé à une culture en aérobiose permettait d'obtenir une croissance bactérienne plus importante que celle obtenue lors des procédés classiques, et qu'en outre, le pourcentage de bactéries viables dans la population bactérienne et la durée de la survie étaient également beaucoup plus importants. Qui plus est, lorsque les levains obtenus de la sorte sont utilisés pour inoculer un produit à fermenter, on observe un redémarrage très rapide de la croissance et de la fermentation bactérienne, se traduisant par une acidification du produit beaucoup plus rapide que celle observée avec des levains classiques. Ces travaux sont décrits dans la Demande Internationale PCT/IB 9901430, déposée le 26 juillet 1999 au nom de l'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE.

Les Inventeurs ont maintenant montré que les améliorations du rendement bactérien et de la viabilité pendant le stockage étaient dues à l'acquisition d'un métabolisme respiratoire par *L. lactis* lors de la culture sous aération et en présence d'un composé porphyrique. Lors de l'inoculation du produit à fermenter, les bactéries sont en outre capables de restaurer immédiatement un métabolisme fermentaire, ce qui se traduit par l'augmentation des performances de redémarrage.

Le métabolisme respiratoire nécessite la présence de l'équipement enzymatique impliqué dans

différentes voies métaboliques, notamment le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs), la synthèse et l'utilisation d'hème, et la synthèse de cytochromes.

En utilisant des amorces dérivées de l'alignement de séquences de gènes connus comme impliqués dans la respiration chez d'autres bactéries, les Inventeurs ont recherché la présence de gènes homologues chez *L. lactis*. Ils ont ainsi identifié trois gènes codant respectivement pour l'aconitase (enzyme intervenant dans le cycle de Krebs), la ferrochélatase (enzyme intervenant dans la biosynthèse de l'hème en catalysant la formation d'un complexe entre le fer et un composé porphyrique précurseur de l'hème, le complexe ainsi formé pouvant être incorporé dans les cytochromes bactériens), et le cytochrome D.

Ils en outre montré que ces gènes étaient fonctionnels chez *L. lactis*. Ils ont en effet constaté que des bactéries dans lesquelles le gène de l'aconitase ou le gène du cytochrome D est inactivé ne présentent plus de métabolisme respiratoire lorsqu'elles sont cultivées en aérobiose et en présence d'un composé porphyrique contenant du fer. De même, ils ont observé que l'inactivation du gène codant la ferrochélatase entraînait la perte des capacités de métabolisme respiratoire de *L. lactis* dans le cas de cultures effectuées en présence d'un composé porphyrique ne contenant pas de fer, tel que la protoporphyrine, mais pas dans le cas de cultures effectuées en présence d'un composé porphyrique contenant du fer, tel que l'hème.

Ces observations confirment que l'amélioration des performances des levains lactiques obtenue par les Inventeurs en préparant ces levains en aérobiose et en présence d'un composé porphyrique est liée à l'apparition d'un métabolisme respiratoire dans ces conditions de culture.

La présente invention a pour but de fournir d'autres moyens de conférer un métabolisme respiratoire à des bactéries lactiques, ou de favoriser celui-ci, notamment afin d'améliorer les performances des levains lactiques de manière comparable à celle observée par les Inventeurs lors de l'addition d'hème (ou d'autres molécules dérivées des porphyrines). Conformément à la présente invention, ce but peut être atteint en provoquant ou en favorisant l'expression, chez une bactérie lactique, d'au moins une protéine participant à ce métabolisme, par exemple au moins une protéine intervenant dans le cycle de Krebs, et/ou au moins une protéine intervenant dans la voie de biosynthèse de l'hème, et/ou moins une protéine intervenant dans la voie de biosynthèse des cytochromes.

Avantageusement, ceci peut être effectué en transférant chez une bactérie lactique un ou plusieurs des gènes de ces protéines, clonés à partir d'une bactérie aérobie.

La présente invention a pour objet une bactérie lactique transformée par au moins un gène hétérologue codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme respiratoire.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit gène est choisi parmi :

- les gènes codant pour des protéines du cycle de Krebs ;
- les gènes codant pour des protéines de la voie de biosynthèse de l'hème ;
- les gènes codant pour des protéines de la voie de biosynthèse des cytochromes.

Selon un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, ladite bactérie lactique est choisie parmi les bactéries des genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Propionibacteria*, ou *Bifidobacteria*. Des bactéries

préférées sont celles des différentes espèces du genre *Lactococcus*, ainsi que des streptocoques de l'espèce *Streptococcus thermophilus*.

Pour une espèce bactérienne donnée, le ou les
 5 gène(s) appropriés pour conférer aux bactéries tout ou
 partie de l'équipement enzymatique nécessaire à
~~l'acquisition d'un métabolisme respiratoire peuvent être~~
 identifiés par l'homme du métier à partir de
 l'information sur les séquences des génomes bactériens
 10 disponible sur les bases de données, qui permet
 d'identifier les gènes déjà présents dans un
 microorganisme donné et les voies métaboliques auxquelles
 peuvent participer ces gènes. A défaut de la séquence
 génomique de l'espèce bactérienne d'intérêt, la ou les
 15 séquence(s) d'une ou plusieurs espèces voisine est (sont)
 utilisable(s) pour déterminer quels gènes sont
 probablement présents. Par exemple, les séquences
 complètes ou quasi complètes du génome de plusieurs
 espèces de streptocoques (*Streptococcus pneumoniae*,
 20 *Streptococcus pyogenes*, et partiellement *Streptococcus*
mutans) sont actuellement disponibles, et révèlent la
 présence de plusieurs des gènes requis pour la
 respiration. Ces espèces sont phylogénétiquement proches
 de bactéries lactiques couramment utilisées dans
 25 l'industrie alimentaire telles que les streptocoques
 thermophiles, et sont également apparentées aux
 lactocoques.

Ainsi, la transformation de bactéries de
 l'espèce *Lactococcus* ou *Streptococcus* par un ou plusieurs
 30 gène(s) codant pour une ou plusieurs protéine(s) de la
 voie de biosynthèse de l'hème peut permettre d'obtenir
 des bactéries possédant un métabolisme respiratoire sans
 qu'il soit nécessaire d'ajouter de dérivés porphyriques
 au milieu de culture.

35 Les gènes souhaités peuvent être obtenus à
 partir d'une bactérie aérobie stricte, ou d'une bactérie

aérobie facultative. Ils peuvent aisément être identifiés à partir des génomes bactériens disponibles sur les bases de données. Par exemple, on peut utiliser des gènes obtenus à partir de *Bacillus subtilis*, qui est une bactérie aérobie, et dont la séquence génomique complète a été publiée.

On peut ainsi apporter à une bactérie lactique la totalité des gènes nécessaires pour conférer un métabolisme respiratoire à cette bactérie. On peut également, si on le souhaite, n'apporter qu'une partie de ces gènes, par exemple afin d'être en mesure de contrôler de différentes manières les conditions dans lesquelles la bactérie sera capable de respirer.

On peut ainsi construire, à titre d'exemples non-limitatifs :

- une bactérie lactique possédant la totalité des gènes nécessaires au métabolisme respiratoire ; la commutation entre un métabolisme fermentaire et un métabolisme respiratoire peut être contrôlée par modification de la teneur en oxygène du milieu de culture ;

- une bactérie lactique possédant la totalité des gènes codant les protéines du cycle de Krebs et la totalité des gènes des cytochromes, mais dépourvue de tout ou partie des gènes de la voie de biosynthèse de l'hème ; la commutation d'un métabolisme fermentaire à un métabolisme respiratoire, nécessitera alors, outre l'aération du milieu, l'addition d'hème ou de l'un de ses précurseurs.

Pour l'obtention d'une bactérie lactique transformée conforme à l'invention, le ou les gène(s) souhaité(s) peuvent être introduits séparément, ou au moins une partie d'entre eux peut être regroupée en un ou plusieurs opéron(s).

Par exemple, pour conférer à *L. lactis* une capacité totale ou partielle de biosynthèse de l'hème, on

peut transférer dans *L. lactis* l'un ou les deux opérons de l'hème de *B. subtilis* ou bien seulement certains des gènes présents sur ces opérons.

Pour obtenir des bactéries lactiques conformes à l'invention on peut aussi favoriser l'expression de gènes intervenant dans le métabolisme respiratoires ~~naturellement déjà présents chez lesdites bactéries. Ceci~~ peut être effectué par exemple en agissant sur la régulation en *cis* ou en *trans* de l'activité de ces gènes.

Des bactéries lactiques conformes à l'invention peuvent être obtenues en mettant en œuvre des techniques classiques de génie génétique, connues en elles-mêmes de l'homme de l'art. Le ou les gènes souhaités peuvent être associés à des séquences de contrôle de la transcription et de la traduction fonctionnelles dans la bactérie lactique que l'on souhaite transformer. On peut notamment, si on le souhaite, placer un ou plusieurs des gènes transférés sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur inductible, afin de permettre de contrôler la commutation entre métabolisme fermentaire et métabolisme respiratoire.

Les constructions réalisées sont placées dans un vecteur approprié pour les introduire dans la bactérie lactique concernée. Des vecteurs utilisables pour transformer des bactéries lactiques de différentes espèces, et permettant soit de maintenir l'information génétique introduite sous forme d'un réplicon indépendant stable, soit de l'intégrer au chromosome bactérien, sont connus en eux-mêmes. Dans les cas où la quantité d'information génétique à transférer nécessite l'introduction de grands segments d'ADN on peut utiliser les techniques de fusion de protoplastes ou de conjugaison bactérienne.

Le fonctionnement du métabolisme respiratoire chez la bactérie transformée peut être vérifié en effectuant la culture de ladite bactérie dans des

conditions permettant l'induction d'un métabolisme respiratoire (c'est à dire sous aération, et éventuellement, en conditions d'induction d'un ou plusieurs promoteurs inductibles contrôlant éventuellement l'expression d'un ou plusieurs des gènes transférés et/ou en présence d'hème ou de l'un de ses précurseurs dans le cas où la bactérie transformée ne comprend pas la totalité des gènes de la voie de biosynthèse de l'hème, etc.), et en mesurant les paramètres suivants : i) le pH de la culture finale, ii) les produits consommés ou formés pendant la croissance (par exemple l'oxygène consommé, la production de fumarate ou celle de lactate, la quantité de carbone totale en fin de culture, qui permet notamment d'évaluer la production de CO₂ pendant la respiration, etc.), iii) la population bactérienne en fin de croissance, iv) la survie pendant un stockage long, et v) les propriétés de ré-acidification lorsque la souche transformée est utilisée comme un démarreur de culture pour une fermentation.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation d'une souche de bactérie lactique conforme à l'invention pour l'obtention d'un levain lactique.

La présente invention a également pour objet un procédé de production de levain lactique, caractérisé en ce qu'il comprend la culture d'au moins une souche de bactérie lactique conforme à l'invention en conditions permettant l'induction d'un métabolisme respiratoire chez ladite souche.

Lesdites conditions d'induction du métabolisme respiratoire comprennent l'aération de la culture ; avantageusement, cette aération est effectuée de manière à maintenir, pendant toute la durée de la culture, une teneur en oxygène égale à au moins 5 millimoles par litre de milieu de culture.

La récolte des bactéries peut ensuite être effectuée par tous moyens connus en eux-mêmes ; on peut par exemple répartir la culture dans des conditionnements appropriés et la conserver sous cette forme jusqu'à utilisation ; généralement, on préférera toutefois séparer les bactéries du milieu de culture et les concentrer par centrifugation ou par filtration. Les bactéries récoltées peuvent ensuite être conditionnées en vue de leur conservation.

La présente invention englobe également les levains lactiques comprenant au moins une souche de bactérie lactique transformée conforme à l'invention.

Ces levains peuvent également comprendre une ou plusieurs autres souches bactériennes, d'une même espèce ou d'espèces différentes. Plusieurs espèces ou plusieurs souches différentes peuvent avoir été cultivées simultanément (dans le cas où leurs conditions optimales de croissance sont compatibles), ou bien cultivées séparément et réunies après la récolte.

Les levains lactiques conformes à l'invention peuvent être récoltés et conservés dans les mêmes conditions que les levains lactiques de l'art antérieur, et notamment que les levains lactiques qui font l'objet de la Demande PCT IB/99 01430 ; ils possèdent des propriétés de conservation et de redémarrage au moins comparables à celles de ces derniers.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs d'obtention de bactéries lactiques conformes à l'invention.

EXEMPLE 1 : OBTENTION D'UNE SOUCHE DE L. LACTIS EXPRIMANT LES GENES NECESSAIRES POUR PRODUIRE DU PROTOHEME IX

Les gènes *hemA* (NADP(H) :glutamyl-tRNA reductase, numéro d'accès SWISS-PROT: P16618), *hemL* (GSA 2,1-aminotransférase, numéro d'accès SWISS-PROT : P30949), *hemB* (Porphobilinogen synthase, numéro d'accès

SWISS-PROT : P30950), *hemC* (hydroxymethylbilane synthase, numéro d'accès SWISS-PROT : P16616), *hemD* (Uroporphyrinogène III synthase, numéro d'accès SWISS-PROT : P21248), et *hemE* (Uroporphyrinogène decarboxylase, 5 numéro d'accès SWISS-PROT : P32395), *hemF* (Coproporphyrinogène III oxydase, numéro d'accès SWISS-PROT : P54304), *hemY* (*hemG*) (Protoporphyrinogène oxydase) (SWISS-PROT : P32397) et *hemH* (*hemF*) (ferrochélatase, 10 numéro d'accès SWISS-PROT : P32396) de *Bacillus subtilis* permettent la synthèse du protohème IX à partir du glutamyl-tRNA.

Les gènes *hemACDBL* contenus dans un seul opéron chez *B. subtilis* sont amplifiés par PCR à partir de la souche 168 [ANAGNOSTOPOULOS et SPITZIZEN, J. 15 Bacteriol. 81, 741-746, (1961)] en utilisant des amorces permettant d'obtenir la séquence codante du gène avec le site de fixation des ribosomes et son terminateur :

Amorce sens :

5'-CTGCTGTTTTTGGTATTGTC-3',.

20 Amorce antisens :

5'-GTATGAACTGGAGAAAATATG-3'.

L'amplification [5 mn 96°C, (15 s. 96°C, 15 s. 50°C, 7 mn 72°C) 30 fois] est effectuée avec 5 unités de Vent Polymérase (New England Biolabs) en présence de 4 mM 25 de MgSO₄.

Un fragment de 6700 pb est obtenu. Ce fragment est ensuite cloné sur le plasmide pBSKS+ (STRATAGENE) au site *SmaI* dans la souche XL1Blue (STRATAGENE) sous contrôle du promoteur P23 [VAN DER VOSSEN et al., Appl. 30 Environ. Microbiol., 53, 2452-2457, (1984)] préalablement cloné dans ce plasmide. Le plasmide obtenu, dénommé pBS-UROIII, est linéarisé par *NotI* et intégré au site *NotI* du plasmide pILNew13 [RENAULT et al., Gene, 183, 175-182 (1996)]. Le plasmide résultant dénommé pIL-UROIII est 35 introduit dans la souche de *L. lactis* MG1363 [GASSON, J. Bacteriol., 154, 1-9, (1983)]. La production

d'uroporphyrinogène III par cette souche est déterminée comme précédemment décrit par ANDERSON et IVANOVICS, [J. Gen. Microbiol., 49, 31-40, (1967)].

5 Les gènes *hemEHY* contenus dans un seul opéron chez *B. subtilis* sont amplifiés par PCR à partir de la souche 168 en utilisant des amorces permettant d'obtenir la séquence codante du gène avec le site de fixation des ribosomes et son terminateur :

amorce sens :

10 5'-TTGCCGTATGAAAGGTGGAAATC-3',

amorce antisens :

5'-TCATAACCTGCTGTTCAATTCAATC-3'.

L'amplification [5 mn 96°C, (15 s. 96°C, 15 s. 50°C, 4 mn 72°C) 30 fois] est effectuée avec 5 unités de Vent Polymérase en présence de 4 mM de MgSO₄. Un fragment de 3600 pb est obtenu. Ce fragment est ensuite cloné sur le plasmide pBSKS+ au site *Sma*I dans la souche XL1Blue sous contrôle du promoteur P23 préalablement cloné dans ce plasmide. Le plasmide obtenu, dénommé pBS-PIX, est linéarisé par *Not*I, puis les extrémités sont rendues franches par la Polymérase I. Ce fragment est ensuite intégré au site unique *Sma*I du plasmide pNZ2120 [PLATTEUW et al. Appl. Environ. Microbiol. 62:1008-13 (1996)]. Le plasmide résultant dénommé pLac-PIX est introduit dans la souche de *L. lactis* MG1363 contenant le plasmide pIL-UROIII. La production de protohème IX par cette souche est déterminée comme décrit par SHIBATA, [Methods of biochemical analysis, D. Glick (Ed.), Interscience, New York, Vol. VII, 77-109, (1959)].

REVENDECATIONS

1) Bactérie lactique transformée par au moins un gène hétérologue codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme respiratoire.

2) Bactérie lactique selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit gène est choisi parmi :

- les gènes codant pour des protéines du cycle de Krebs ;

- les gènes codant pour des protéines de la voie de biosynthèse de l'hème ;

- les gènes codant pour des protéines de la voie de biosynthèse des cytochromes.

3) Bactérie lactique selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les bactéries des genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, ou *Enterococcus*.

4) Bactérie lactique selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une souche de l'espèce *Lactococcus* ou *Streptococcus* transformée par au moins un gène codant pour une protéine de la voie de biosynthèse de l'hème.

5) Procédé de production d'un levain lactique, caractérisé en ce qu'il comprend la culture d'au moins une souche de bactérie lactique selon une quelconque des revendications 1 à 4, en conditions permettant l'induction d'un métabolisme respiratoire chez ladite souche

6) Levain lactique comprenant au moins une souche de bactérie lactique transformée selon une quelconque des revendications 1 à 3.

7) Procédé de préparation d'un produit fermenté, caractérisé en ce qu'il comprend l'ensemencement d'un milieu à fermenter à l'aide d'un levain lactique selon la revendication 6.

8) Utilisation d'un levain lactique selon la revendication 6 pour la préparation d'un produit fermenté.

La récolte des bactéries peut ensuite être effectuée par tous moyens connus en eux-mêmes ; on peut par exemple répartir la culture dans des conditionnements appropriés et la conserver sous cette forme jusqu'à utilisation ; généralement, on préférera toutefois séparer les bactéries du milieu de culture et les concentrer par centrifugation ou par filtration. Les bactéries récoltées peuvent ensuite être conditionnées en vue de leur conservation.

La présente invention englobe également les levains lactiques comprenant au moins une souche de bactérie lactique transformée conforme à l'invention.

Ces levains peuvent également comprendre une ou plusieurs autres souches bactériennes, d'une même espèce ou d'espèces différentes. Plusieurs espèces ou plusieurs souches différentes peuvent avoir été cultivées simultanément (dans le cas où leurs conditions optimales de croissance sont compatibles), ou bien cultivées séparément et réunies après la récolte.

Les levains lactiques conformes à l'invention peuvent être récoltés et conservés dans les mêmes conditions que les levains lactiques de l'art antérieur, et notamment que les levains lactiques qui font l'objet de la Demande PCT IB/99 01430 ; ils possèdent des propriétés de conservation et de redémarrage au moins comparables à celles de ces derniers. L'invention comprend également l'utilisation de ces levains lactiques pour la préparation de produits fermentés, et tout procédé de préparation d'un produit fermenté comprenant l'ensemencement d'un milieu à fermenter à l'aide d'un levain lactique conforme à l'invention.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs d'obtention de bactéries lactiques conformes à l'invention.

EXEMPLE 1 : OBTENTION D'UNE SOUCHE DE L. LACTIS EXPRIMANT LES GENES NECESSAIRES POUR PRODUIRE DU PROTOHEME IX

Les gènes *hemA* (NADP(H) :glutamyl-tRNA reductase, numéro d'accès SWISS-PROT: P16618), *hemL* (GSA 2,1-aminotransférase, numéro d'accès SWISS-PROT : P30949), *hemB* (Porphobilinogen synthase, numéro d'accès

